



Potencial de hongos de pudrición blanca en el tratamiento de pesticidas para el desarrollo de biocamas

Potential for white rot fungi in the treatment of pesticides for the development of biobeds

Rodríguez, María E.^{1*} ; Beatriz G. Pergassere¹ ; Carlos M. Kubach¹ ; Ariel E. Ortiz¹ ; Florencia V. Grasso^{1,2} ; Patricia Montoya^{1,2} ; Paola A. Campitelli¹ ; Lucio G. Robledo^{1,3,4} 

¹ Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Centro de Biotecnología Aplicada al Agro y Alimentos (Bio_{tec}A³), Félix Marrone 746 CP. 5000, Córdoba, Argentina.

² Universidad Nacional de Córdoba, Facultad de Ciencia Exactas, Físicas y Naturales, Instituto en Ciencia y Tecnología de los Alimentos (ICTA), Av. Vélez Sarsfield 1666, CP. 5016, Córdoba, Argentina.

³ Fundación Fungicosmos, www.fungicosmos.org, Córdoba, Argentina.

⁴ Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), Buenos Aires 1418 CP. 5000, Córdoba, Argentina.

* Autor corresponsal: 0000-0002-5334-5438; eugenia@agro.unc.edu.ar

RESUMEN

Los pesticidas han contribuido a la productividad y calidad de la producción agrícola pero su inadecuada utilización puede contaminar el ambiente. Las biocamas son sistemas de biorremediación utilizados para prevenir contaminaciones puntuales con agroquímicos durante el proceso de llenado de los equipos de fumigación. En este trabajo se realizó una selección de cepas de hongos de pudrición blanca para el diseño de biomezclas con residuos agrícolas de la provincia de Córdoba. Se evaluó la actividad enzimática de los hongos frente a cuatro pesticidas de uso común en los sistemas productivos de la región central de Argentina. *Trametes villosa* CCC32 fue la cepa que presentó mejor actividad enzimática y se seleccionó para el desarrollo de la biomezcla. Se elaboraron biocamas a escala de laboratorio con la cepa seleccionada y cascarilla de girasol como sustrato lignocelulósico. Se determinó la actividad enzimática de fenoloxidasas en las biocamas. Los bioensayos con extractos de las

► Ref. bibliográfica: Rodríguez, M. E.; Pergassere, B. G.; Kubach, C. M.; Ortiz, A. E.; Grasso, F. V.; Montoya, P.; Campitelli, P. A.; Robledo, L. G. 2022. Potencial de hongos de pudrición blanca en el tratamiento de pesticidas para el desarrollo de biocamas. *Lilloa* 59 (Suplemento): 63-76. doi: <https://doi.org/10.30550/j.lil/2022.59.S/2022.08.11>

► Recibido: 16 de junio 2022 – Aceptado: 11 de agosto 2022 – Publicado en línea: 18 de octubre 2022.

► URL de la revista: <http://lilloa.lillo.org.ar>

► Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



biomezclas luego de 240 días de tratamiento mostraron un índice de germinación del 60 %. Los resultados obtenidos en las mediciones enzimáticas y la evaluación fitotóxica en las biocamas a escala de laboratorio son promisorios y sugieren un gran potencial de las biomezclas para el desarrollo de biocamas a escala real.

Palabras clave — Biocamas; biodegradación; micorremediación; pesticidas; *Trametes villosa*.

ABSTRACT

Pesticides have contributed to improve the productivity and quality of agricultural production however, but their inadequate use can pollute the environment. Biobeds are bioremediation systems used to prevent specific contamination with agrochemicals during the filling process of fumigation equipment. In this work, a selection of strains of white rot fungi was made for the design of biomixtures with agricultural residues from the province of Córdoba. The enzymatic activity of the fungi was evaluated against four pesticides commonly used in the productive systems of the central region of Argentina. *Trametes villosa* CCC32 was the strain that showed the best enzymatic activity and was selected for the development of the biomixture. Laboratory scale biobeds were developed with the selected strain and sunflower husk as the lignocellulosic substrate. The enzymatic activity of phenoloxidases in the biobeds was determined. The bioassays with extracts of the biomixtures showed after 240 days of treatment a germination rate of 60%. The results obtained in the enzymatic measurements and the phytotoxic evaluation carried out in biobeds at laboratory scale are promising and suggest a great potential of biomixtures for the development of real scale biobeds.

Keywords — Biobeds; biodegradation; mycoremediation; pesticides; *Trametes villosa*.

INTRODUCCIÓN

Los agroquímicos han contribuido a la productividad y calidad de la producción agrícola. Sin embargo, cuando son utilizados inadecuadamente pueden contaminar el ambiente (Flaherty *et al.*, 2013; Gao *et al.*, 2015; Tortella *et al.*, 2012). A fin de mitigar los efectos adversos se han establecido Programas de Buenas Prácticas Agropecuarias (BPA), con carácter de ley en algunas regiones (Ley 10633 – Córdoba) y que son apoyados por distintas instituciones públicas y privadas y aplicadas por los agricultores (Elorza y Moavro, 2020). Las BPA se deben reforzar incorporando nuevas tecnologías que actúen como barreras o sistemas de biopurificación que protejan a los recursos suelo y agua (Díaz *et al.*, 2012).

Una de las estrategias que pueden emplearse es la de utilización de camas biológicas o biocamas. Las biocamas se desarrollaron originalmente en Suecia como respuesta a la necesidad de sistemas simples y eficaces para minimizar la contaminación ambiental por el uso de agroquímicos. Están destinadas al tratamiento de derrames de agroquímicos durante el llenado y almacenamiento de equipos de fumigación (Castillo y Torstensson, 2008).

Las biocamas constituyen una unidad que involucra tres componentes, i.e. arcilla, biomezcla y césped, cada uno con una importante función en la retención y la degradación de los agroquímicos. Son sistemas flexibles que se adaptan a varios tipos de producción y su aplicación en distintos lugares del mundo (v.g. Inglaterra, Bélgica, Italia, Francia, Perú, Guatemala, Chile) se ha realizado con modificaciones al diseño original dependiendo de las características de los agroquímicos y materiales disponibles localmente (Castillo y Torstensson, 2008). La biocama está compuesta en su mayor parte por la biomezcla, un sustrato compuesto por una mezcla de residuos lignocelulósicos vegetales (v.g. rastrojos y otros residuos del agro, aserrín, etc.) Este tipo de sustrato constituye el medio ideal para el crecimiento de los hongos de pudrición blanca como *Trametes villosa* (Sw) Kreisel y *Trametes versicolor* (L.) Lloyd, cuyo sistema enzimático degrada eficazmente la lignina, así como otros compuestos estructuralmente análogos, incluyendo pesticidas (Quintero Díaz, 2011). La capacidad de los hongos de pudrición blanca como agentes micorremediadores se ha estudiado con resultados prometedores. Se ha demostrado la degradación de la atrazina mediada por *Pleurotus ostreatus* (Jacq.) P. Kumm., INCQS 40310, confirmando su potencial como agente de biorremediación (Pereira *et al.*, 2013; Cupul *et al.*, 2014). Otros estudios han descripto que *Trametes versicolor* tiene la capacidad de degradar al 2,4-D (Hernández-Mendieta *et al.*, 2013). La aplicación del concepto de biocamas implica una investigación intensiva para adaptarlo a las condiciones, prácticas y necesidades locales, evaluando variables como clima, volúmenes a tratar, materiales locales, etc. (Castillo y Torstensson, 2008; Castillo *et al.*, 2011). El desarrollo de biocamas y su implementación en las Buenas Prácticas Agrícolas permitiría prevenir y/o disminuir contaminaciones puntuales generadas en puntos críticos, como son los derrames de agroquímicos en el lavado de los equipos de fumigación, contribuyendo a lograr prácticas de manejo sustentables. El objetivo de este trabajo fue desarrollar una biomezcla con materiales de la región central de Argentina, incluyendo residuos agrícolas locales con alto contenido de lignina, que los hace apropiados para su incorporación en sistemas de biocamas, y cepas de hongos de pudrición blanca nativos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Selección de hongos de pudrición blanca con eficacia en la degradación de pesticidas

Se evaluó el crecimiento (en cm) y la producción enzimática de tres cepas de hongos de pudrición blanca y la tolerancia a tres pesticidas, un organofosforado (glifosato) y dos organoclorados (2,4-D y atrazina). Se seleccionaron 3 cepas de especies autóctonas probadas y sugeridas en la literatura como potentes hongos ligninolíticos, *Trametes villosa* cepa CCC32, *Funalia gallica* (Fr.) Bondartsev & Singer cepa CCC28 y *Ganoderma resinaceum* Boud. cepa CCC62. Inicialmente se llevaron a cabo ensayos cualitativos en placas de Petri con medio agarizado y tres concentraciones de los pesticidas 1000, 2000 y 3000 mg/L y un control sin pesticida. La tolerancia se estimó en función al crecimiento fúngico. El sistema de cultivo en placa ha sido descripto como una técnica eficiente para la evaluación de la tolerancia de hongos de pudrición

blanca frente a compuestos organoclorados (Serbent *et al.*, 2020). Posteriormente se llevó a cabo un ensayo en medios de cultivo líquidos con los tres pesticidas, para cuantificar la producción de fenoloxidasas (lacasa y manganeso peroxidasa). Los medios de cultivos líquidos se elaboraron con base en un medio enriquecido Kirk modificado (Tien y Kirk, 1988) al que se les adicionaron los pesticidas a diferentes concentraciones: 500, 1000 y 1500 mg/L. La composición del medio líquido Kirk modificado consistió en mezclar: glucosa 10 g, CaCl_2 0,1 g, tartrato de amonio 0,2 g, acetato de sodio 3,3 g, KH_2PO_4 2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$ 0,5 g, tween 80 (0,05%) y 5 mL de elementos trazas (MgSO_4 3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, MnSO_4 0,5 g, CuSO_4 0,1 g, NaCl 1 g, H_3BO_4 0,01 g, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,1 g, $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, CoCl_2 0,1 g, $\text{AlK}(\text{SO}_4) \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,01 g, agua destilada 1000 mL). Las condiciones de concentraciones de pesticidas se establecieron para verificar la tolerancia de las cepas simulando condiciones de manejo donde se manipulan altas cantidades de productos concentrados (lavado de la maquinaria o en el instante de preparación de la mezcla de aplicación). Cada tratamiento, cepa/pesticida/dosis/control sin pesticida, se inoculó con cinco discos (5 mm de diámetro) de colonias crecidas en agar-malta durante siete días. Los tratamientos se incubaron a 28°C durante 45 días sin agitación. Cada tres días se tomaron alícuotas (dos mL) y cuantificaron la producción de fenoloxidasas.

1.1. Determinación de actividad enzimática.— Las actividades enzimáticas de lacasa y de manganeso peroxidasa se determinaron respectivamente mediante la oxidación de 2,6-dimetoxifenol ($\epsilon_{469} = 27500 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Paszczynski *et al.*, 1988) y rojo fenol ($\epsilon_{610} = 4460 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) (Kuwahara *et al.*, 1984) en un espectrofotómetro UV visible – PERKIN ELMER Mod. Lambda 250.

Para determinar la actividad de lacasa, a 100 μL de muestra se adicionó 3 mL de una solución de 0,1 M de acetato de sodio y 5 mM 2,6-DMP (pH 4,5) en cubetas de 3 mL. La absorbancia fue medida a 469 nm por un minuto. Para determinar la actividad de manganeso peroxidasa, a 500 μL de muestra se adicionó 1000 μL de una solución de 20 mM de succinato de sodio (pH 4,5) y 500 μL Mix reactivos (0,1 ml de rojo de fenol 0,1%, 0,1 ml de lactato de sodio 250 mM, 0,2 ml de albúmina bovina 0,5%, 0,05 ml de MnSO_4 2 mM, 0,05 ml de H_2O_2 2 mM), luego se incubó 5 minutos a baño maría 30°C y se agregó 40 μL de hidróxido de sodio (2M). La absorbancia fue medida a 610 nm. La actividad enzimática fue expresada como unidades por mililitro donde una unidad de actividad (U) se definió como la cantidad de enzima necesaria para transformar un mol de sustrato por minuto.

2. Caracterización de los componentes de la biomezcla

Para este estudio se formularon biomezclas utilizando suelo, material lignocelulósico y turba. El suelo se extrajo del campo escuela de la Facultad de Ciencias Agropecuarias, tomando material de los primeros 20 cm de profundidad. Como material lignocelulósico se utilizó cascarilla de girasol proveniente de la región sudeste de Córdoba. Se realizó la siguiente caracterización físico-química del suelo y del residuo lignocelulósico: conductividad eléctrica (dS/m), pH, nitrógeno (mg/kg), fósforo total

(mg/kg), cenizas (%) y materia orgánica (%). A demás se completó la caracterización de la cascarilla de girasol con los siguientes parámetros: lignina ácido soluble (%), lignina Klason (%), lignina total (%), extracto etéreo (%) y holocelulosa (%). Las técnicas de análisis de caracterización de suelos y del residuo lignocelulósico se describen en las Tablas 1 y 3 respectivamente.

Tabla 1. Técnicas de análisis de los suelos.

Table 1. Soil analysis techniques.

Características		Técnicas de análisis
CE	Conductividad eléctrica (ds/m)	Relación 1/2,5 a 25 °C
pH	Potencial de Hidrógeno	Relación 1/2,5
N	Nitrógeno Total (%p/p)	Método Kjeldhal
P	Fósforo Total (mg/kg)	Método de Bray y Kurtz (1945)
MO	Materia Orgánica (%)	Calcinación en mufla (Page <i>et al.</i> , 1982)
C	Cenizas (%)	Calcinación en mufla (Page <i>et al.</i> , 1982)

Tabla 2. Caracterización físico-química de los suelos.

Table 2. Physical and chemical characterization of soils.

Características		
CE	Conductividad eléctrica (ds/m)	0,063
pH	Potencial de Hidrógeno	6,89
N	Nitrógeno Total (%p/p)	0,128
P	Fósforo Total (mg/kg)	27,0
MO	Materia orgánica (%)	10,07
C	Cenizas (%)	89,92

Tabla 3. Técnicas de análisis de caracterización físico-química de los residuos lignocelulósicos.

Table 3. Analysis techniques for physical-chemical characterization of lignocellulosic residues.

Características		Técnicas de análisis
LAS	Lignina ácido soluble (%)	Norma TAPPI (1999) T222 om
LK	Lignina Klason (%)	Norma TAPPI (1999) T222 om
L	Lignina Total (%)	Norma TAPPI (1999) T222 om
EE	Extracto etéreo (%)	Norma TAPPI (1999) T204 om-88
C	Cenizas (%)	Calcinación en mufla (Page <i>et al.</i> , 1982)
H	Humedad (%)	Norma TAPPI (1999) T258 om-89
N	Nitrógeno Total (%p/p)	Método Kjeldhal
P	Fósforo Total (mg/kg)	Método de Bray y Kurtz (1945)
COT	Carbono orgánico total (%)	Calcinación en mufla (Page <i>et al.</i> , 1982)
Ho	Holocelulosa (%)	Por cálculo $Ho = 100 - (EE + H + C + L)$
pH	Potencial de Hidrógeno	Relación 1/2,5
CE	Conductividad eléctrica (ds/m)	Relación 1/2,5 a 25 °C

3. Sistemas de biocamas a escala de laboratorio

Las biocamas se armaron en recipientes plásticos rectangulares de 15 cm ancho, 32 cm de largo y 10 cm de alto (Fig. 1). La biomezcla se formuló con materiales previamente esterilizados en autoclave, de la siguiente manera: 50% v/v de sustrato lignocelulósico (cascarilla de girasol), 25% v/v de turba y 25% v/v de suelo. Posteriormente se procedió a inocular con la cepa seleccionada, previamente crecida sobre semillas de avena (500 g) en condiciones estériles durante 10/15 días a 28 °C. Las biocamas se realizaron por triplicado y se mantuvieron cubiertas con film perforado para disminuir las pérdidas por evaporación y permitir la oxigenación.

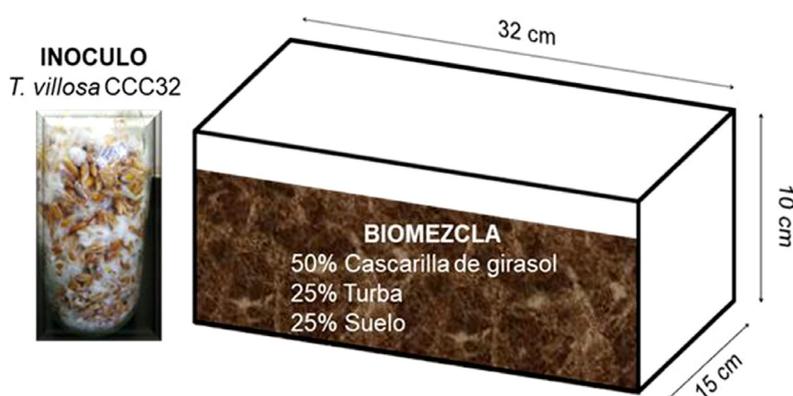


Fig. 1. Esquema de la biocama.

Fig. 1. Scheme of the biobed.

Se aplicó manualmente una mezcla de pesticidas (glifosato, 2,4-D y atrazina) con rociadores sobre las biocamas. Dichas aplicaciones se ejecutaron en tres etapas: una primera dosis de 100 mg i.a/kg de biomezcla, una segunda dosis de 200 mg i.a/kg a los 30 días de iniciado el ensayo y una tercera dosis de 300 mg i.a/kg a los 60 días. Conjuntamente se prepararon biocamas control sin adicionar pesticidas. Las biocamas se mantuvieron a temperaturas que oscilaron entre 17-25°C y humedad alrededor del 50%. Se tomaron muestras (peso muestra húmeda 10 g) con una jeringa adaptada (tres cm de diámetro) asegurando tomar los 10 cm de profundidad de la biocama, con una frecuencia de 15 días durante el período de ensayo. Las muestras fueron depositadas en bolsas de polietileno y refrigeradas para posteriores análisis de la actividad enzimática (lacasa y manganeso peroxidasa) y pH. El diseño experimental realizado en las biocamas se basó de acuerdo a referencias bibliográficas (Diez Jerez *et al.*, 2013).

3.1. Obtención de fracción soluble para valoración de la actividad enzimática.—

Alícuotas (10 g) de la biomezcla correspondientes a los diferentes tiempos de la incubación se resuspendieron con 50 mL de agua destilada. La suspensión resultante se agitó a 400 rpm a 30°C durante 40 minutos. Posteriormente se filtró la suspensión y la fracción acuosa se centrifugó a 9000 rpm durante 10 minutos a 4 °C. Las cuantificaciones enzimáticas se realizaron por los métodos descriptos anteriormente.

4. Bioensayo de fitotoxicidad

Para evaluar el potencial de la cepa seleccionada en las camas biológicas se realizaron bioensayos de germinación de semillas de lechuga (*Lactuca sativa* var. Criolla) siguiendo el método descrito por Zucconi *et al.* (1981).

Se colocó un papel de filtro en el interior de una caja de Petri, el que se impregnó con 3 ml de la solución proveniente de extracciones realizadas de muestras sólidas de las biocamas tomadas a los 120 días posteriores a la tercera aplicación de pesticidas. En paralelo se midió el pH y la actividad biológica a través de la presencia de fenoloxidasas. El tratamiento control se hidrató con agua destilada. Se colocaron en forma equidistante 20 semillas de *L. sativa* previamente hidratadas en agua por 30 minutos. Las cajas así preparadas se sellaron con papel film, se envolvieron con papel de diario y se incubaron por siete días a 25 °C. El tratamiento y control se hicieron por cuadruplicado. Finalizado este periodo se contaron las semillas que habían germinado en cada caja y se midió la longitud de la radícula.

El índice de germinación (IG) se calculó de la siguiente manera:

$$IG (\%) = \frac{G}{G_0} * \frac{L}{L_0} * 100$$

Donde G = N° de semillas germinadas del tratamiento; G₀ = N° de semillas germinadas de control; L = Longitud de la radícula del tratamiento; L₀ = Longitud de la radícula del control.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Selección de hongos de pudrición blanca

En el ensayo en placas se observó de manera general una inhibición del crecimiento fúngico ante la presencia de pesticidas respecto al control sin pesticidas. Se observó una respuesta positiva de la cepa *T. villosa* CCC32, siendo la más competente y tolerante a los pesticidas. Los tratamientos con *T. villosa* CCC32, exhibieron crecimiento micelial en todos los medios sólidos con atrazina y solamente en la concentración más baja (1000 mg L⁻¹) con glifosato. Los diámetros de halos de crecimiento alcanzados a los 14 días variaron en un rango de 19-27 mm en medios con atrazina, correspondiendo los menores valores a los niveles más altos del pesticida y 11-15 mm en el medio enriquecido con glifosato.

Los tratamientos con 2,4-D manifestaron un leve crecimiento fúngico (9 mm) y la presencia de un halo color marrón, al igual que en los medios con atrazina. El tratamiento control de *T. villosa* CCC32 mostró crecimiento fúngico (con un halo de crecimiento a los 14 días de 25 mm de diámetro) sin la presencia de halos de color.

Las cepas *F. gallica* CCC28 y *G. resinaceum* CCC62, mostraron un incipiente crecimiento en condiciones de 1000 mgL⁻¹ de atrazina. A diferencia de *T. villosa* CCC32, las placas no mostraron la presencia de halos de color en ningún tratamiento (control y agar-pesticidas).

En los ensayos de cultivo líquido, todas las cepas de hongos sintetizaron enzimas con actividad lacasa. En los tratamientos con el aislamiento *T. villosa* CCC32, los máximos valores de la enzima lacasa se registraron en los medios con atrazina y 2,4-D, siendo superiores al control (sin pesticida). Los valores de lacasa obtenidos fueron 54,55 U ml⁻¹ en medios con atrazina (500 mg L⁻¹) y 15,37 U ml⁻¹ en medios con 2,4-D (1500 mg L⁻¹), a los 39 días de cultivo. En los tratamientos con glifosato, *T. villosa* CCC32 no presentó una respuesta enzimática, sin embargo, la especie *F. gallica* CCC28 registró los máximos valores de actividad de lacasa de 3,56 U ml⁻¹ a los 17 días de incubación en concentraciones de 500 mg L⁻¹. En concentraciones máximas, 1500 mg L⁻¹, la actividad de lacasa mostró un aumento constante llegando a un valor de 2,93 U ml⁻¹ a los 30 días de crecimiento. En relación a los ensayos con 2,4-D, se midieron los máximos enzimáticos de 5,02 U ml⁻¹ en concentraciones de 1500 mg L⁻¹. En los tratamientos con atrazina la respuesta de lacasa fue menor que en los medios con 2,4-D y glifosato. En el tratamiento control de *F. gallica* CCC28 se observó un valor de máxima actividad de lacasa (10,49 U ml⁻¹) a los 36 días, siendo superior a los tratamientos con pesticidas. *G. resinaceum* CCC62 presentó los valores más bajos de actividad de lacasa en todos los tratamientos evaluados comparado con las otras especies fúngicas. La actividad máxima detectada fue de 2,67 U ml⁻¹ en el ensayo con 2,4-D (500 mg L⁻¹), alcanzando un valor inferior comparado al tratamiento control, que registró un máximo enzimático de 23,2 U ml⁻¹. Con respecto a la enzima manganeso peroxidasa no se detectó su presencia en ningún tratamiento. Varios estudios sugieren que el aumento de las actividades de lacasa y MnP podrían estar relacionado con el estrés oxidativo en los hongos ligninolíticos generados por la atrazina, considerándose un mecanismo de defensa (Bastos y Magan, 2009; Nikolaou et al., 2009; Zhang et al., 2012; Zhu et al., 2008). Sin embargo, esta respuesta no es una regla general, puesto que ello es dependiente del aislamiento utilizado, el cual puede responder de manera diferente a distintos pesticidas (Cupul et al., 2014). Se ha reportado que cepas de *T. versicolor* tuvieron un crecimiento positivo en medios de cultivo enriquecidos con 2,4-D y los proponen como herramienta potencial de biodegradación del pesticida (Hernández-Mendieta et al., 2013). Los resultados de varios estudios destacan el potencial de las enzimas ligninolíticas para transformar los pesticidas (Pizzul et al., 2009).

Las tres especies en estudio mostraron actividad enzimática de lacasa en presencia de los pesticidas seleccionados y los resultados sugieren que su habilidad para sintetizarlas indicaría un potencial prometedor en la degradación de los mismos.

Con base en los resultados obtenidos en estos dos ensayos se seleccionó la cepa *T. villosa* CCC32 con mayor capacidad de tolerancia frente a los pesticidas estudiados y producción enzimática en sustratos enriquecidos con pesticidas. Ambos ensayos sirvieron para definir las concentraciones de pesticidas utilizadas posteriormente en el armado de las biocamas a escala laboratorio.

Biocamas

Las características físico-químicas de los suelos, cascarilla de girasol y turba se presentan en las Tablas 2 y 4. La composición de la biomezcla caracterizada presentó

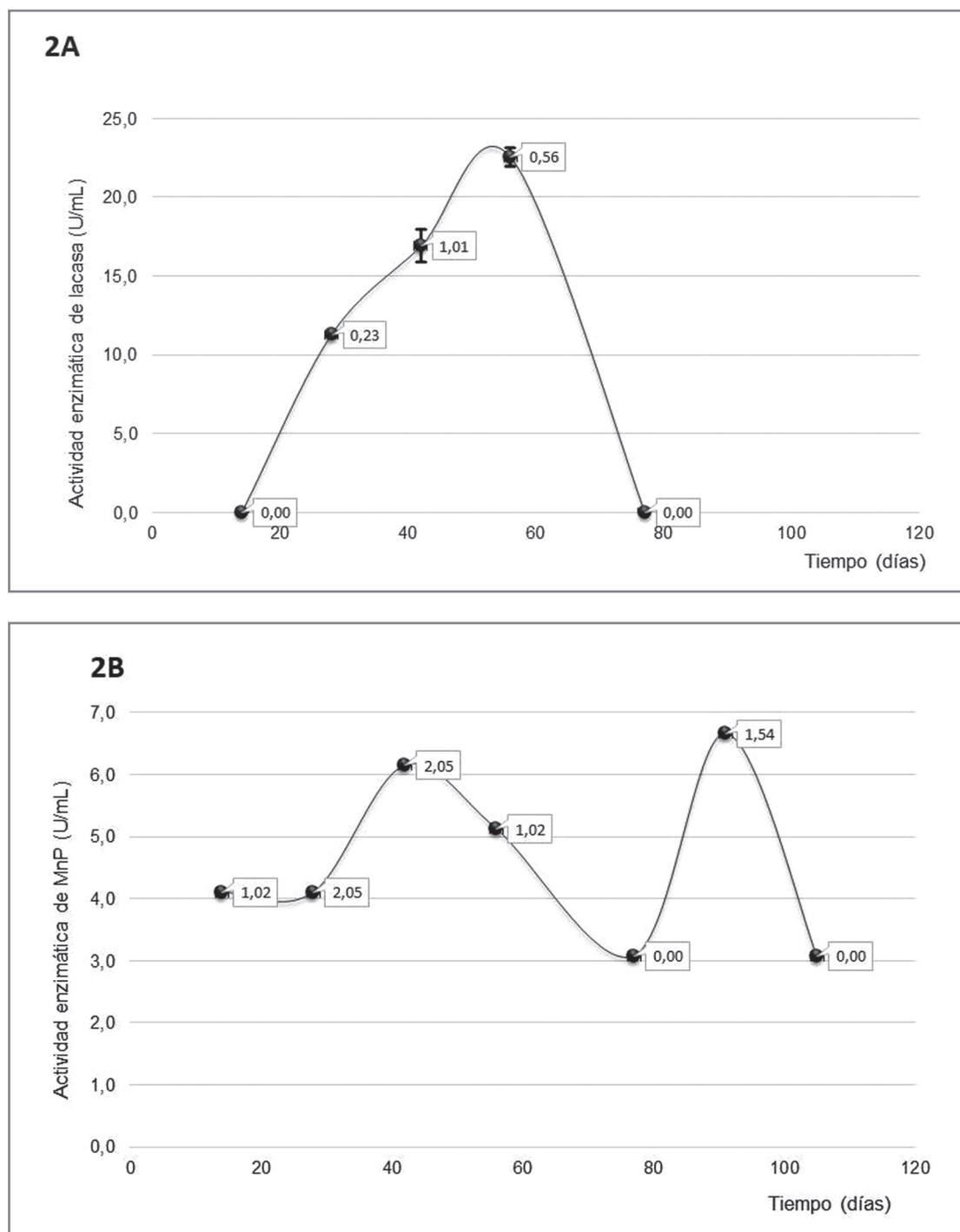


Fig. 2. Actividad enzimática en las biocamas. A) Lacasa. B) Manganese peroxidasa.

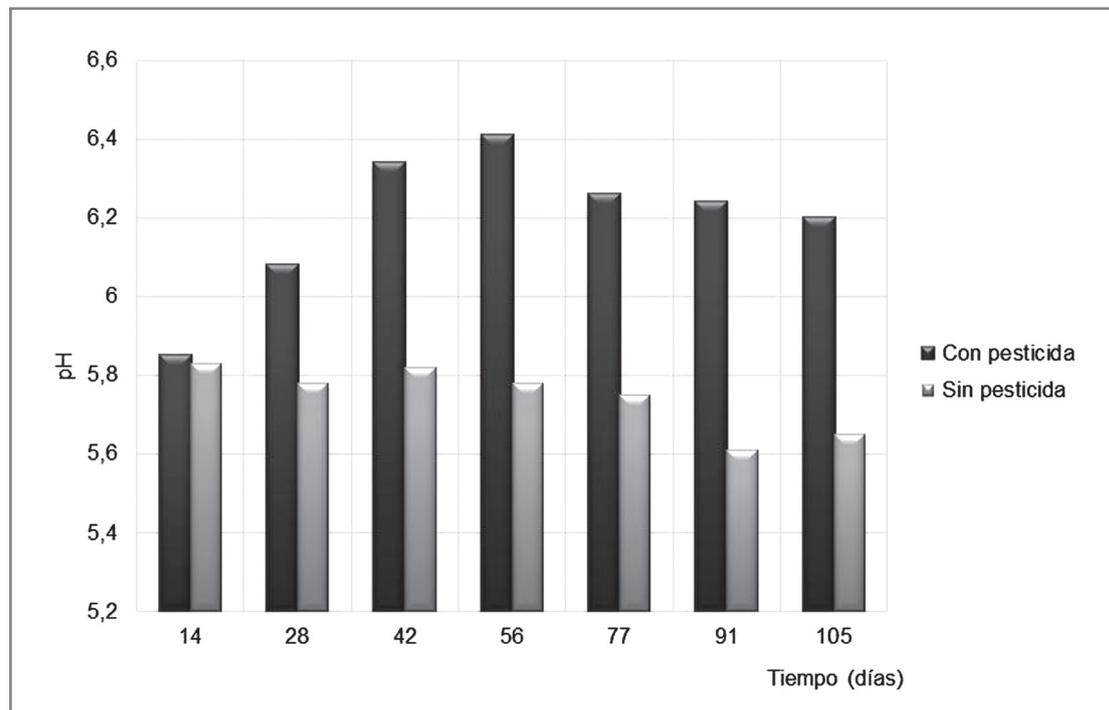
Fig. 2. Determination of enzyme activity in biobeds. A) Laccase. B) Manganese peroxidase.

una relación carbono/nitrógeno (C/N) de 71 y pH de 5,8. Se observó una variación del pH en las biocamas a lo largo del estudio, mostrando un incremento inicial de 5,85 a 6,41 y luego un descenso a 6,20 (Fig. 3). Este leve incremento de pH probablemente sea por la adición de pesticidas, ya que comparado con los controles el rango de pH varió de 5,83 a 5,66. Sin embargo los valores de pH se mantuvieron en valores ligeramente ácidos, lo que favorece la actividad de *T. villosa* CCC32.

Tabla 4. Caracterización físico-química del residuo lignocelulósico y turba.**Table 4.** Physical-chemical characterization of lignocellulosic residue and peat.

Características	Cascarilla de girasol	Turba comercial
LAS Lignina ácido soluble (%)	0,932	sin determinar
LK Lignina Klason (%)	44,28	sin determinar
L Lignina Total (%)	45,203	sin determinar
EE Extracto etéreo (%)	5,03	sin determinar
C Cenizas (%)	3,696	0,5 - 1,5
H Humedad (%)	8,806	65 - 69
N Nitrógeno Total (%p/p)	0,426	2,0
P Fósforo total (mg/kg)	247	sin determinar
MO Materia orgánica (%)	96,48	98,5 - 99,5
COT Carbono orgánico total (%)	55,96	57,16 - 57,71
PS Polisacáridos (%)	37,265	sin determinar
pH Potencial de Hidrógeno	5,93	3,0
CE Conductividad eléctrica (ds/m)	0,63	1,6

Se ha sugerido que las biomezclas con relación C/N mayores a 30, pH menores a 6 y ricas en lignina favorecen la liberación de las enzimas fenoloxidasas y por lo tanto su acción degradadora de sustratos (Pizzul *et al.*, 2009). La cascarilla de girasol es un sustrato muy rico en lignina, contiene un 45,2 % de lignina total formada por un 44,28 % de lignina Klason y un 0,932% de lignina ácido soluble. Las actividades enzimáticas de manganeso peroxidasa y lacasa se registraron alrededor de los 14 y 28 días de iniciado el ensayo. Llegando a valores máximos promedio de actividad de

**Fig. 3.** pH en las biocamas con *T. villosa* CCC32.**Fig. 3.** pH measurement in biobeds of *T. villosa* CCC32.

lacasa de $23 \text{ U mL}^{-1} \pm 0,56$ a los 56 días de tratamiento (Fig. 2A). La actividad de manganeso peroxidasa mostró dos picos de $6,15 \pm 2,05$ y $6,66 \pm 1,54 \text{ U mL}^{-1}$ a los 42 y 91 días de tratamiento (Fig. 2B). En las muestras tomadas al finalizar el estudio (240 días de iniciado el bioensayo), se cuantificó una producción enzimática de lacasa de $22,5 \text{ U mL}^{-1}$, sin detectarse MnP. El valor de pH medido fue de 6,17, manteniendo las condiciones levemente ácidas de la biomezcla. Respecto a las biocamas control (sin pesticidas) mostraron valores de máxima actividad enzimática de $28,6 \text{ U mL}^{-1} \pm 0,27$ para lacasa a los 77 días de ensayo y $15,76 \text{ U mL}^{-1} \pm 0,03$ para la Mn peroxidasa a los 21 días. Estos resultados son indicadores del potencial que tiene la cepa *T. villosa* CCC32 para ser utilizada en procesos de micorremediación, demostrando su capacidad de colonización en la matriz de la biocama y producción de enzimas ligninolíticas en estos sistemas suplementados con pesticidas. Datos publicados indican que la actividad fenoloxidasa se correlaciona con la disipación de la mayoría de los pesticidas en una mezcla (Castillo y Torstensson, 2007).

En los bioensayos de fitotoxicidad se observó un índice de germinación (IG) del 60%. Valores de índice de germinación (IG) $\geq 80\%$ indicarían que no hay sustancias fitotóxicas o están en muy baja concentración; si el IG $\leq 50\%$ indicaría que hay una fuerte presencia de sustancias fitotóxicas y si se obtiene un valor entre 50% y 80% se interpretaría como la presencia moderada de estas sustancias (Zucconi *et al.*, 1981).

La evaluación fitotóxica en las biocamas, utilizando especies de gran sensibilidad como *L. sativa*, demostró una posible disipación de las sustancias inhibitorias de germinación y elongación radicular. La detección de fenoloxidasas demostró la capacidad biológica de la cepa *T. villosa* CCC32 para desarrollarse en biomezclas formuladas con cascarilla de girasol como sustrato y presencia de pesticidas. Las enzimas como lacasa y Mn peroxidasa son de gran relevancia para los procesos degradativos de pesticidas realizada por hongos de pudrición blanca y demostrado en varios estudios científicos (Castillo y Torstensson, 2007).

CONCLUSIÓN

Las tres cepas de hongos de pudrición blanca estudiadas mostraron tener habilidad para sintetizar enzimas con actividad oxidativa en los sistemas de cultivo suplementados con los pesticidas seleccionados. *Trametes villosa* CCC32 mostró los mayores niveles de actividad y ser la más tolerante a los pesticidas. Los resultados obtenidos en las biocamas a escala de laboratorio son promisorios, se observó una reducción de la fitotoxicidad pos tratamiento en la formulación con *T. villosa* CCC32. Los resultados obtenidos sugieren la factibilidad de desarrollar sistemas de biocamas a escala real con biomezclas formuladas con hongos de pudrición blanca y sustratos lignocelulósicos residuos del agro. Estas dos variables, cepa y sustrato son claves para que esta tecnología funcione correctamente y se adapten a las distintas condiciones regionales.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el apoyo y facilidades brindadas por la Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba y al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET). El apoyo financiero fue proporcionado por el proyecto PROIINDIT “Utilización de hongos de pudrición blanca en biorremediación de pesticidas en suelo”, Resolución HCD 281/2017. Los autores también agradecen el apoyo financiero y técnico brindado por Fundación Fungicosmos.

BIBLIOGRAFÍA

- Bastos, A. y Magan, N. (2009). *Trametes versicolor*: potential for atrazina bioremediation in calcareous clay soil, under low water availability conditions. *International Biodeterioration and Biodegradation* 63: 389-394.
- Bray, B. y Kurtz, L. (1945). Determination of total organic and available forms of phosphorus in soils. *Soil Science* 59: 39-45.
- Castillo, M. d. P. y Torstensson, L. (2007). Effect of biobed composition, moisture and temperature on the degradation of pesticides. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 55 (14): 5725-5733.
- Castillo, M. d. P. y Torstensson, L. (2008). Biobeds - Biotechnology for environmental protection from pesticide pollution. In *Methods and Techniques for Cleaning-up Contaminated Sites*; Annable, M. D., Teodorescu, M., Hlavinec, P., Diels, L., Eds. Springer 145-151. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-6875-1_13
- Castillo, M. d. P., Torstensson, L. y Stenström, J. (2011). Biobeds for environmental protection from pesticide use: A review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56: 6206-6219.
- Cupul, W., Abarca, G., Vázquez, R., Salmones, D., Hernández, R. y Gutiérrez, E. (2014). Respuesta de macrohongos ligninolíticos al herbicida atrazina: bioensayos dosis-respuesta. *Revista Argentina de Microbiología* 46: 348-357. [https://doi.org/10.1016/S0325-7541\(14\)70094-X](https://doi.org/10.1016/S0325-7541(14)70094-X)
- Díaz, J., Palma, G., Tortella, G., Rubilar, O. y Diez, M. C. (2012). Lecho Biológico: Eficaz sistema para la degradación de residuos de plaguicidas. *Revista Red Agrícola* 45: 44.
- Diez Jerez, M., Palma Cifuentes, G., Altamirano Quijada, C., Briceño Muñoz, G., Calderón Ramírez, C., Díaz Sánchez, J., Rubilar Araneda, O. y Tortella Fuentes, G. (2013). Manual de construcción y operación de lechos biológicos. Universidad de La Frontera. Temuco, Chile. ISBN 978-956-236-235-1.
- Elorza, F. M. y Moavro, E. A. (2020). Jornadas de Buenas Prácticas de Aplicación de Productos Fitosanitarios (BPAF) con énfasis en los entornos periurbanos. Serie de Informes Especiales ILSI Argentina. Volumen X Julio. ISBN 978-987-21507-8-5.
- Flaherty, R. J., Nshime, B., De La Marre, M., De Jong, S., Scott, P. y Lantz, A. W. (2013). Cyclodextrins as complexation and extraction agents for pesticides from contaminated soil. *Chemosphere* 91: 912-920.

- Gao, W., Liang, J., Pizzul, L., Feng, X. M., Zhan, K. y Castillo, M. (2015). Evaluation of spent mushroom substrate as substitute of peat in Chinese biobeds. *International Biodeterioration and Biodegradation* 98: 107-112.
- Hernández-Mendieta, E., Guillén-Sánchez, D., López-Martínez, V., Tejacal, I., Andrade-Rodríguez, M., Villegas-Torres, O., Martínez Fernández, E., Huerta-Lara, M. y Segura-Miranda, A. (2013). Identificación del agente causal de la pudrición blanca en Morelos, México. *Revista Colombiana de Biotecnología* 15 (2): 1-8. <https://doi.org/10.15446/rev.colomb.biote.v15n2.41744>.
- Ley 10633-Córdoba. "Programas de Buenas Prácticas Agropecuarias de Córdoba". Legislatura de la provincia de Córdoba. 16 de octubre del 2019. http://www.alimentosargentinos.gob.ar/bpa/documentos/LEY_BPA_cordoba.pdf
- Kuwahara, J., Glenn, M., Gold, M. y Gold, M. H. (1984). Separation and characterization of two extracellular H₂O₂ dependent oxidases from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Letters* 169 (2): 247-250.
- Nikolaou, E., Agrafioti, I., Stumpf, M. y Quinn, I. S. (2009). Alistair. Phylogenetic diversity of stress signaling pathways in fungi. *BMC Evolutionary Biology* 9: 1-18.
- Page, A., Millar, R. y Keney, D. (1982). Methods of soil analysis. Parte 2 Agronomy Monograph 9 A.S.A. y SSSA Madison, Wisconsin.
- Paszczynski, A., Crawford, R. L. y Huynh, V. B. (1988). Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Methods in Enzymology* 161 (b): 264-270.
- Pereira, P. M., Teixeira, R. S. S., Oliveira, M. A. L., Silva, M. y Santana, V. F. L. (2013). Optimized Atrazine Degradation by *Pleurotus ostreatus* INCQS 40310: an Alternative for Impact Reduction of Herbicides Used in Sugarcane Crops. *Journal of Microbial and Biochemical Technology* S12: 006. doi: 10.4172/1948-5948.S12-006
- Pizzul, L., Castillo, M. del P. y Stenström, J. (2009). Degradation of glyphosate and other pesticides by ligninolytic enzymes. *Biodegradation* 20 (6): 751-759.
- Quinteros Díaz, J. C. (2011). Revisión: Degradación de Plaguicidas Mediante Hongos de la Pudrición Blanca de la Madera. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín* 64 (1): 5867-5882.
- Serbent, M. P., Guimarães, D. K. S., Drechsler-Santos, E. R., Helm, C. V., Giongo, A. y Tavares, L. B. B. (2020). Growth, enzymatic production and morphology of the white-rot fungi *Lentinus crinitus* (L.) Fr. upon 2,4-D herbicide exposition. *International Journal of Environmental Science and Technology* 17 (5): 2995-3012. <https://doi.org/10.1007/s13762-020-02693-1>.
- TAPPI (1999). Test Methods. Technical Association for the Pulp and Paper Industries. TAPPI Press. Atlanta.
- Tien, M. y Kirk, T. K. (1988). Lignin Peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Methods in Enzymology* 161: 238-249.
- Tortella, G., Rubilar, O., Castillo, M. del P., Cea, M., Mella-Herrera, R., y Diez, M. (2012). Chlorpyrifos degradation in a biomixture of biobed at different maturity stages. *Chemosphere* 88: 224-228.
- Zhang, Y., Meng, D., Wang, Z., Guo, H. y Wang, Y. (2012). Oxidative stress response in two representative bacteria exposed to atrazine. *FEMS Microbiology Letters* 334 (2): 95-101.

- Zhu, G., Huang, F., Feng, L., Qin, B., Yang, Y., Chen, Y. y Lu, X. (2008). Sensitivities of *Phytophthora infestans* to Metalaxyl, Cymoxanil, and Dimethomorph. *Agricultural Sciences in China* 7: 831-40.
- Zucconi, F., Pera, A., Forte, M. y De Bertoli, M. (1981). Evaluating toxicity in immature compost. *Biocycle* 22: 54-57.